

Année 1921.

N°

THÈSE

458

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le

1921.

PAR

Jacques-Marie-Albert MAHEU,

Né à Montmorency, le 31 août 1873.

DOCTEUR ES-SCIENCES,

PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE,

CHEF DE LABORATOIRE DES HOPITAUX DE PARIS,

MICROGRAPHE EXPERT AU LABORATOIRE D'ÉTUDE ET D'ANALYSE (MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE).

ESSAI BACTÉRIOLOGIQUE ET CHIMIQUE

DES

PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES

dites « Ferments lactiques »

Président : M. ACHARD, Professeur.

Juges : MM. { } Agrégés.

Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses
parties de l'enseignement médical.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1921

458

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le 1921.

PAR

Jacques-Marie-Albert MAHEU,

Né à Montmorency, le 31 août 1873.

DOCTEUR ES-SCIENCES,

PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE,

CHEF DE LABORATOIRE DES HOPITAUX DE PARIS,

MICROGRAPHE EXPERT AU LABORATOIRE D'ÉTUDE ET D'ANALYSE (MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE).

ESSAI BACTÉRIOLOGIQUE ET CHIMIQUE

DES

PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES

dites « Ferments lactiques »



Président : M. ACHARD, Professeur.

Juges : MM. {

} Agrégés.

Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS.

LE DOYEN : M. ROGER.

PROFESSEURS :

MM.

Anatomie.....	NICOLAS.
Anatomie médico-chirurgicale.....	CUNEO.
Physiologie.....	Ch. RICHET.
Physique médicale.....	André BROCA.
Chimie organique et chimie générale.....	DESGREZ.
Bactériologie.....	BEZANÇON.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.....	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générale.....	Marcel LABBÉ.
Pathologie médicale.....	RENON.
Pathologie chirurgicale.....	LECÈNE.
Anatomie pathologique.....	LETULLE.
Histologie.....	PRENANT.
Opérations et appareils.....	DUVAL.
Pharmacologie et matière médicale.....	POUCHET.
Thérapeutique.....	CARNOT.
Hygiène.....	BERNARD.
Médecine légale.....	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	MÉNÉTRIÉR.
Pathologie expérimentale et comparée.....	ROGER.
Clinique médicale.....	ACHARD,
	WIDAL.
	GILBERT.
	CHAUFFARD.
Hygiène et clinique de la première enfance.....	MARFAN.
Clinique des maladies des enfants.....	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.....	DUPRÉ.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	JEANSELME.
Clinique des maladies du système nerveux.....	P. MARIE.
Clinique des maladies contagieuses.....	TEISSIER.
	DELBET.
Clinique chirurgicale.....	LEJARS.
	HARTMANN.
	GOSSET.
Clinique ophtalmologique.....	De LAPERSONNE.
Clinique des maladies des voies urinaires.....	LEGUEU.
	BAR.
Clinique d'accouchements.....	COUVELAIRE.
	BRINDEAU.
Clinique gynécologique.....	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile.....	BROCA Auguste.
Clinique thérapeutique.....	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique.....	SEBILEAU.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.

ABRAMI.
ALGLAVE.
BASSET.
BAUDOUIN.
BLANCHETIÈRE.
BRANCA.
CAMUS.
CHAMPY.
CHEVASSU.
CHIRAY.
CLERC.
DEBRÉ.
DESMAREST.

MM.

DUVOIR.
FIESSINGER.
GARNIER.
GOUGEROT.
GRÉGOIRE.
GUÉNIOT.
GUILLAIN.
GUILLEMINOT.
HEITZ-BOYER.
JOYEUX.
LABBÉ (Henri).
LAIGNEL-LAVASTINE.
LANGLOIS.

MM.

LARDENNOIS.
LE LORIER.
LEMIERRE.
LEQUEUX.
LEREBoullet.
LÉRI.
LÉVY-SOLAL.
MATHIEU.
METZGER.
MOCQUOT.
MULON.
OKINCZYC.
PHILIBERT.

MM.

RATHERY.
REITERER.
RIBIERRE.
RICHAUD.
ROUSSY.
ROUVIÈRE.
SCHWARTZ.
TANON.
TERRIEN.
TIFFENEAU.
VILLARET.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MA FEMME.

A MON FILS.

A MES AMIS.

A MES MAÎTRES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR KIRMISSON,

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
CHIRURGIEN DES HOPITAUX,
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

MONSIEUR LE PROFESSEUR BROCA (AUGUSTE),

CHIRURGIEN DES HOPITAUX,
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

*Collaborateur de ces deux Maîtres durant
de longues années pour les travaux de
laboratoire, nous avons toujours reçu
d'eux le meilleur accueil et nous ne
pouvons que les associer dans le même
sentiment de reconnaissance.*

A MON CHEF DE SERVICE MONSIEUR ROUX,
DOCTEUR ES-SCIENCES,
DIRECTEUR DES SERVICES SCIENTIFIQUES AU MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE,
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

A MON MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ACHARD,

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

A MES MAÎTRES DANS LES HOPITAUX :

MESSIEURS LES PROFESSEURS ET MÉDECINS DES HOPITAUX,

MARFAN, ACHARD, GUINON (Louis), MERY,
POTOKY, SAUVAGE.

INTRODUCTION.

Considérations générales sur la Bactériothérapie lactique.

C'est au Professeur HAYEM, que nous devons le moyen efficace de réaliser sans danger l'antiséptie intestinale. En attirant l'attention du monde médical sur la valeur antiputride de l'acide lactique, cet auteur approcha de très près la solution de la question.

Cette action antiputride, démontrée par HAYEM, a été contrôlée par GRUNDZACH (1), SCHMITZ (2) et SINGER (3). Ces auteurs insistèrent sur ce fait que l'acide lactique diminue la quantité des éthers sulfo-conjugués de l'urine, en rapport avec l'état plus ou moins accentué des putréfactions intestinales.

Ce fut METCHNIKOFF (4) qui, en 1904, laissa entrevoir la possibilité de lutter contre la fermentation intestinale, en ensemençant l'intestin avec des cultures de Bacilles lactiques. Puis en 1907, dans ses « *Essais optimistes* »,

(1) GRUNDZACH. — *Zeits f. Kl. Méd. T.*, p. 70, 1893.

(2) SCHMITZ. — *Zeitschrift für physiol. chimie*, vol. XIX, p. 401, 1894.

(3) SINGER. — *Terapeutische Monatshefte*, p. 441, 1901.

(4) METCHNIKOFF. — *La vieillesse*, 1904,

et dans son livre « *Médicaments microbiens* », en 1918, dans ses « *Essais sur la nature humaine* », le même auteur accuse la flore microbienne des désordres généraux, vieillissant prématurément l'organisme. D'où, le principe thérapeutique formulé par ce savant : le remplacement de la flore intestinale nuisible par une flore bactérienne nouvelle et éminemment favorable.

Remplacer, dans la médication lactique, l'acide lactique, par le microbe lactique lui-même. Cet acide à l'état naissant, transformera le milieu alcalin, en milieu acide, défavorable aux fermentations putrides.

Nous ne voulons pas étudier ici les effets médicaux, rechercher les cas où la médication peut être appliquée, déterminer le rôle du ferment lactique en présence des bactéries de l'intestin et exposer les résultats obtenus.

Mais, comme le choix des espèces lactiques ne saurait être indifférent, que les bacilles doivent être sélectionnés, vivants, produire la plus grande quantité possible d'acide lactique, pour obtenir le maximum de rendement. Nous avons pensé que l'exposé des méthodes appliquées dans notre laboratoire pour juger leur valeur médicamenteuse, pourrait être intéressant pour les médecins et les experts.

Notre travail a été effectué au Laboratoire central d'études et d'analyses des produits médicamenteux et hygiéniques, à la Faculté de Pharmacie dirigé par M. FAYOLLE, nous le prions de croire à l'assurance de notre respectueuse amitié.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à M. le Professeur GRIMBERT, membre de l'Académie de Médecine,

professeur à la Faculté de Pharmacie, et à M. FRANÇOIS, docteur ès-sciences, Pharmacien des Hôpitaux, sous-directeur au Laboratoire central d'études et d'analyses, pour les savants conseils qu'ils n'ont cessé de nous prodiguer durant le cours de nos recherches. Nous n'aurions garde d'oublier M. MALMY, pharmacien de 1^{re} classe, chimiste au Laboratoire de la Pharmacie centrale, pour les documents fournis si aimablement.

PLAN DU TRAVAIL.

INTRODUCTION. — Considérations générales sur la Bactériothérapie lactique

CHAPITRE PREMIER. — Historique : Nécessité du contrôle bactériologique et chimique des « ferments lactiques ».

CHAPITRE II. — Des préparations lactiques, leurs examens de laboratoire.

CHAPITRE III. — Examens bactériologiques des préparations lactiques.

a) Technique.

b) Revivifications des espèces.

c) Milieux de cultures.

d) Ensemencements.

e) Séparations des espèces.

f) Résultats : Comprimés. Bouillons.

CHAPITRE IV. — Caractères microscopiques des espèces isolées :

1° Méthode de coloration.

2° Caractères des bactéries.

CHAPITRE V. — Bactéries de la fermentation lactique.

CHAPITRE VI. — Description des espèces isolées des préparations lactiques. *Bacillus lacticus* ; *B. bulgaricus* ; *B. mesentericus* ; *B. caucasicus* ; *B. bifidus* ; *Streptococcus acidilactici* ; Levures.

CHAPITRE VII — Etudes chimiques des préparations lactiques.

Recherche et dosage de l'acide lactique :

1° Procédé par extraction à l'éther.

2° Méthode Bertrand et Weisweiller.

3° — Bouvet.

4° — de Bellet.

5° — de dosage par pesée de la chaux dissoute.

6° — personnelle.

a) Milieu de culture.

b) Ensemencement.

c) Recherche qualitative de l'acide lactique.

d) Dosage.

e) Recherche de l'acide lactique préexistant dans les préparations lactiques.

CHAPITRE VIII. — Résultats obtenus :

Préparations sèches : 1° Comprimés ; 2° Poudres.

Préparations liquides : Bouillons.

CHAPITRE IX. — Quantité d'acide lactique exigé d'un produit considéré normal.

CHAPITRE X. — Protocole d'expérience pour l'analyse d'une préparation médicinale à ferments lactiques.

CHAPITRE XI. — Conclusions.

CHAPITRE XII. — Bibliographie.

CHAPITRE PREMIER.

Historique.

Nécessité du contrôle bactériologique et chimique des ferments lactiques.

De nombreuses marques de « ferments lactiques » ont envahi le marché industriel sans qu'un procédé permette au pharmacien de les classer par ordre d'activité bactérienne.

Cependant un certain nombre de ces préparations pharmaceutiques ne répondent pas aux besoins de la pratique médicale et les échecs ont pu être attribués au principe même de la méthode.

METCHNIKOFF (1), en 1911, s'exprimait ainsi : « ayant examiné quelques-uns de ces produits, j'ai rencontré au lieu de bacilles bulgares, d'autres microbes sous forme de bacilles tout différents et parfois nuisibles. »

En France, GRIMBERT (2), ayant eu l'occasion d'examiner quelques échantillons de ferments lactiques vendus dans

(1) METCHNIKOFF. — Microbes et longévité. *La Revue*, 15 janvier 1911, p. 145.

(2) GRIMBERT. — *Société de Pharmacie de Paris*, 9 juin 1909.

le commerce, sous des noms déposés, a constaté que l'activité fermentative de ces produits laissait souvent à désirer, quelques-uns même s'étant montrés complètement inertes.

En Allemagne, Artur LUERSSEN et KUHN (1) ont trouvé, dans les préparations qu'ils étudiaient, des microbes protéolytiques totalement étrangers à la fermentation lactique.

R. OEHLER (2) a trouvé du bacille bulgare dans trois échantillons de Yohourt, mais il n'a pu isoler aucune bactérie vivante, dans diverses préparations sèches.

HENNEBERG (3) a examiné sept ferments lactiques secs achetés dans des pharmacies; dans aucun d'eux il n'a trouvé de Bacille bulgare.

Tout dernièrement, EFFRONT (4), étant parti de comprimés pour se procurer du *Bacillus bulgaricus*, vit ses résultats faussés: le bacille obtenu était un bacille protéolytique vulgaire.

Enfin BERTHELOT (A.) et BERTRAND (M.) (5) ont examiné un grand nombre d'échantillons de ferments lactiques. La plupart de ceux examinés par eux, contenaient de petits bacilles lactiques, soit seuls, soit en symbiose avec le Bacille bulgare.

Sur sept cultures liquides, une était une symbiose de Bacille bulgare avec d'autres petits ferments lactiques; une autre une symbiose d'un petit bacille lactique avec du *Bacillus bifidus* (isolé en gélose de Veillon). Les autres contenaient du Bacille bulgare.

(1) Artur LUERSSEN et KUHN.— *Centralblat. fur Bacteriol. Parasitenk und Infektionkr.*, XX, p. 234, 1908.

(2) OEHLER.— *Ueber Yoghurtkontrolle centralblatt b. Bakter.*, T.XXX, 30 mai 1891.

(3) HENNEBERG.— *Trochene oder flussige Yoghurtpreparate. Tageszeitung fur Brauerei*, n° 297, 1751, 19 décembre 1911.

(4) EFFRONT.— *Moniteur scientifique de Quesneville*, août 1911, p. 489.

(5) BERTHELOT (A.) et BERTRAND (M.). — La nécessité d'un contrôle Bactériologique des ferments lactiques pharmaceutiques, *Annales des Falsifications*, p. 164, 1912.

Sur douze échantillons de comprimés ensemencés sur lait, sept sont restés stériles. Ils isolèrent de certains échantillons des microbes protéolytiques aérobies et anaérobies, parmi lesquels *Bacillus subtilis* ; *B. mesentericus*, un *B. fluorescens liquefaciens*. Exceptionnellement *Bacillus perfringens*.

De tout ce qui précède, il résulte qu'il existe, dans le commerce, de bonnes préparations offrant toutes garanties aux médecins ; par contre, il en est d'autres, qui, ou bien n'ont pas de valeur thérapeutique ou peuvent même avoir une action nuisible.

Au XII^e Congrès annuel de l'American therapeutic Society, tenu en mai 1911, à Boston, le D^r H. W. WILEY, appela l'attention sur les préparations lactiques qui deviennent de plus en plus nombreuses et demanda de contrôler sévèrement leur valeur thérapeutique.

En 1912, METCHNIKOFF s'exprimait ainsi : « Je pense qu'il serait utile, que la préparation des ferments lactiques de l'industrie pharmaceutique soit soumis à un contrôle analogue à celui qui s'exerce vis à-vis des sérums thérapeutiques. Je suppose que, dans ces conditions, le traitement par les bacilles lactiques, donnera les meilleurs résultats. »

Depuis cette époque, le Service de la Répression des fraudes a eu à s'occuper de la question. Il nous a été donné de faire l'étude systématique de la plupart des marques commerciales connues ; nous exposerons dans ce mémoire le résultat de nos observations.

Ces dernières portent sur 46 échantillons de comprimés, sur des poudres et sur des préparations de bouillons.

Nous avons exposé ici les méthodes considérées comme les plus rationnelles et les plus commodes, suivant le plan général précédemment exposé.

CHAPITRE II

Des préparations lactiques. — Leur examen de laboratoire.

Depuis que le Professeur METCHNIKOFF (1) démontra que dans la lutte contre la putréfaction intestinale, au lieu d'administrer l'acide lactique en substance, il faut introduire dans l'organisme des cultures de microbes lactiques, bon nombre de spécialistes se sont ingéniés à chercher une forme rationnelle d'administration.

Les uns se sont tenus à réaliser des cultures pures de bacilles lactiques sélectionnés (*Bacillus bulgaricus*, *Bacillus lacticus*, *Streptococcus acidi lactici*) ; d'autres, centrifugeant ces cultures, incorporent le culot de centrifugation à du lactose, transformant le tout en comprimés.

Les préparations officinales courantes peuvent se présenter à l'état frais ou à l'état sec.

Ces préparations comprennent :

1° Les laits.

2° Bouillons ; la plupart sont dosés de façon à préparer 1/3 de litre de lait fermenté.

3° Ferments secs en poudre.

(1) METCHNIKOFF. — Essais optimistes, 1907, page 223.

4° Comprimés.— De dimensions restreintes, ils peuvent facilement s'absorber comme des pilules. Ils sont friables, se dissolvent aisément dans le tube digestif et renferment également des bacilles lactiques.

a) Les laits caillés sont préparés avec du lait, tantôt bouilli, tantôt stérilisé à 120°, tantôt réduit de moitié par ébullition contenus dans des pots de 1/3 à 1/4 de litre.

b) Les bouillons sont des milieux liquides, un moût de bière, non houblonné et dilué suivant la formule donnée par COHENDY (1).

On se sert aussi de macérations végétales lactosées, bouillon de haricots, macération de touraillons, ou des solutions de peptone lactosées. On a de même employé le lactosérum obtenu en coagulant par la presure du lait écrémé.

Les bouillons de corps microbiens sont obtenus en centrifugeant les cultures en milieux liquides au moyen d'une écrémeuse de laiterie modifiée. Tous les corps bacillaires contenus dans un grand volume de liquide s'accumulent sur les parois du bol stérilisé. Ces bouillies se trouvent dans le commerce, renfermés dans de petits tubes d'étain identiques à ceux qui servent pour les couleurs à l'huile.

Pour les préparations sèches, on dessèche le lait caillé, ou le coagulum qui reste dans le filtre presse, après qu'on a essoré le lait caillé, soit le dépôt microbien obtenu par décantation ou centrifugation des cultures liquides. Dessiccation à température inférieure à 40° dans le courant d'air sec, les produits étant étalés en couches minces sur des plateaux.

Le résidu sec broyé, parfois très dur (lorsqu'il provient de la caséine desséchée, il doit être broyé dans un broyeur à boulets ou un moulin à meules métalliques), est vendu

(1) COHENDY (Michel). — *Comp. rendu Soc. biologie*, 17 mars 1906.

en poudre ou en forme de comprimés obtenus avec cette poudre additionnée d'une petite quantité de talc ou de lactose.

Nous ne connaissons qu'imparfaitement la composition de ces comprimés ; à titre de document nous avons réalisé la préparation de comprimés types avec des cultures de *Bacillus bulgaricus* âgées de 15 jours et carbonatées ; nous avons préparé avec du lactose stérilisé une pâte ferme. La masse a été desséchée très lentement à l'étuve à 36°. Le tout a été pulvérisé puis mis en comprimés. Chaque comprimé du poids de 0,50 correspondait environ à 0 cm³,20 de bouillon de culture concentré, soit 2,40 de bouillon de culture ordinaire.

Les ensemencements de ces comprimés furent positifs même après 4 mois de préparation.

Les différents types des préparations soumis à notre examen étaient-ils capables dans des conditions biologiques déterminées de produire de l'acide lactique et dans quelle proportion ?

La possibilité de faire fermenter le lactose étant ici beaucoup plus importante à établir que la nature des ferments employés, cette étude comprenait donc deux sortes de recherches :

1) Isolement, détermination et étude des espèces produisant la fermentation.

2) Production d'acide lactique et son dosage.

Pour résoudre ces questions, chaque variété de préparation a servi à mettre en culture des ballons de 100 cm³ de bouillon de touraillon dont nous donnons ultérieurement la composition. Sur les cultures réalisées, furent entreprises les recherches bactériologiques et chimiques dont nous exposons ci-après les méthodes et les résultats.

CHAPITRE III

Examen bactériologique des préparations lactiques.

L'essai bactériologique doit mettre en évidence :

a). L'existence de ferments lactiques vivants.

b). L'absence d'impuretés nuisibles (microbes protéolytiques ou producteurs d'acides gras).

A). L'existence de ferments lactiques vivants sera constatée : s'il s'agit de *B. bulgare*, par ensemencement sur lait écrémé stérilisé, et cultivé à la température 38-40°. Il pousse moins bien sur les milieux artificiels et exige un certain entraînement pour pousser dans ces milieux.

Pour identifier le *B. bulgare* il faudra ensemer sur gélose sucrée en *profondeur* pour cultiver en anaérobie.

B). S'il s'agit de ferments lactiques indigènes (*Streptococcus*, *B. acidi lactici*, etc...), l'ensemencement sera fait dans du lait stérile écrémé ou non. Culture à 37°.

On identifiera ensuite en cultivant en *surface* sur gélose glucosée ou maltée.

L'absence d'impuretés nuisibles est visible par examen direct. En effet, les lactiques vrais font cailler le lait sans que sa surface présente ni boursouflures ni traces de peptonisation, au moins pendant les trois ou quatre premiers

jours de culture, car à la longue le caillé se sépare et est surnagé par une couche légère de sérum. Si le caillé présente un aspect anormal, faire des ensemencements en gélatine et en gélose, en surface et en profondeur.

I. — Technique.

Comme les comprimés, les poudres ou les bouillons examinés peuvent contenir des espèces très différentes : nous avons été amené à employer une technique générale pouvant s'appliquer à toutes les marques commerciales.

1° Revivification des germes. Ferments secs et liquides.

Afin de revivifier les agents de la fermentation lactique, nous ensemençons nos comprimés ou 1 cm³ de la préparation liquide dans du lait pasteurisé au préalable. On maintient pendant 4 ou 5 heures le lait à l'étuve à 37°, puis, avant qu'il n'ait caillé, on l'ajoute au milieu artificiel suivant, qui fermente convenablement et rapidement (1).

Lactose.....	100 gr.
Peptone	1
Phosphate bipotassique.....	0,2
Chlorure ammoniac.....	1
Craie préparée.....	50
Eau	600

Ces souches sont alors ensemencées dans le bouillon de touraillon suivant, où les espèces lactiques prennent leur plus grand développement.

(1) KUFFERATH. — Sur le mode d'ensemencement des ferments lactiques dans les milieux sucres artificiels employés par l'industrie. *Bull. Soc. biologie*, N° LXXXII, 21 février 1920, p. 199.

2° Préparation du milieu de culture.

Touraillon.....	300 gr.
Eau.....	1.000

Faire bouillir un quart d'heure, passer avec expression, ajouter :

Peptone.....	10 gr.
Lactose.....	20

Faire dissoudre, filtrer, répartir dans des ballons de 100 cm³. Ajouter dans chaque ballon 3 gr. de carbonate de chaux précipitée, stériliser à l'autoclave à 110°.

3° Ensemencements.

Chaque ballon a été ensemencé avec un comprimé flambé pour enlever les espèces superficielles. Il est ensuite pulvérisé aseptiquement, maintenu 48 heures à l'étuve à 37°. Pour les milieux liquides, ensemercer aseptiquement 1 cm³ de la préparation.

4° Elimination des saprophytes.

Pour isoler à l'état de pureté les espèces lactiques (*Bacillus bulgaricus*, *B. lacticus*, *Streptocoques lactiques*, etc...), nous avons pratiqué des cultures des comprimés et des bouillons dans des milieux identiques, mais phéniqués. A chaque ballon de 100 cm³, on ajoute 40 gouttes d'eau phéniquée au 1/20°. Les espèces lactiques se développent bien dans ces conditions.

5° Séparations des espèces développées.

Toutes les espèces développées dans les deux milieux de cultures, phéniqué ou non, sont séparées par ensemencements, en gélatine, sur boîtes de Pétri.

6° Recherche des anaérobies.

Cultures en tubes de Veillon, pour les préparations liquides. Pour les comprimés et les tubes, il est bon de les émulsionner dans un peu d'eau distillée stérilisée.

7° Evaluation de la richesse bactérienne.

Cet examen permet de se rendre compte de la conservation des bactéries.

Pour les liquides, on pourra ajouter du bleu de méthylène à une portion de bouillon chauffé quelques instants à 80° pour tuer les bactéries, ce qui augmente leur affinité pour les colorants, puis en examiner une goutte après homogénéisation.

Pour les comprimés, on dissout dans un volume d'eau cinq centimètres cubes; s'il y a lieu, on ajoute une ou deux gouttes d'acide acétique pour dissoudre les carbonates et les phosphates terreux qui font parfois partie de l'excipient du comprimé; on ajoute un peu d'éosine et on examine entre lames et lamelles.

Ce procédé, très simple, permet déjà de se rendre compte de l'énorme différence des titres bactériens relatifs aux diverses marques commerciales.

8° Numération bactérienne.

Cette dernière peut être pratiquée facilement sur les formes de préparations liquides. On procède comme pour les eaux, en faisant des dilutions successives de façon à établir les plaques de Pétri avec gélatine,ensemencées par des dilutions très élevées de la préparation.

On a pu calculer ainsi que nombre de préparations ont une teneur énorme en bactéries.

Marque C : Mélange de plusieurs espèces. Plus de 50 millions de bactéries par centimètre cube.

Marque B (*Bacillus Bulgaricus*): Plus de 35 millions de bactéries par centimètre cube.

II. — Résultats bactériologiques (1).

1° Comprimés ou Poudres.

Dans quelques cas très rares, les cultures sont demeurées tout à fait stériles (n° 16).

Un grand nombre de comprimés examinés ne renferment que deux saprophytes (15 échantillons).

1° *Bacillus subtilis* (nos 1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 25, 26, 30, 36, 43).

2° *Bacillus mesentericus* (n° 28).

Il est à noter que les deux espèces citées sont absolument inactives sur le lactose (2).

Dans les comprimés cités, nous n'avons isolé que l'une de ces deux espèces, vraisemblablement parce que les ferments lactiques vrais étaient morts, ou parce que ceux encore vivants, en trop petite proportion, ne purent résister à l'action antagoniste des espèces saprophytes.

Dans d'autres échantillons, on observe des espèces du groupe des bactéries lactiques.

Tantôt ce sont des espèces bien définies répondant au *Bacillus Bulgaricus* (ferments nos 3, 20, 27, 34, 32, 35, 37, 44) ou bien ce sont des espèces représentant les ferments lactiques normaux du lait indigène et constituées par les variétés de *Bacilles lactiques*, de *Streptocoques lactiques* ou même de *levures* (ferments nos 18, 31, 25,

(1) Les numéros correspondent à l'enregistrement de chacune de nos analyses.

(2) MACÉ. — Traité pratique de Bactériologie, 1913, tome II, p. 514-519.

22, 33, 39, 40, 41, 42). Parfois nous avons isolé de certains comprimés les espèces constituanes du képhir : *Bacillus Caucasasicus* Kern (*Dispora caucasica*) Levures, etc... (nos 2, 13, 23).

2° Préparations liquides.

Ce n'est qu'exceptionnellement que les préparations liquides ne nous ont pas donné de cultures. Quelques marques renferment du *Bacillus Bulgaricus*, d'autres une symbiose de *Bacillus lacticus* de Pasteur et de *Streptococcus acidi lactici* ; toutes ont donné des cultures pures, jamais de saprophytes.

CHAPITRE IV.

Caractères microscopiques des espèces isolées.

Chaque espèce isolée a été colorée pour être étudiée morphologiquement.

1° Méthode de coloration.

La plupart des espèces lactiques sont teintées faiblement par le bleu de méthylène. Elles se colorent bien par la fuchsine, la thionine, le violet de méthyle phéniqué. Le réactif de choix est la fuchsine de Ziehl phéniqué ; ils prennent tous le Gram.

Nous avons employé pour leur coloration dans les cultures, la méthode suivante (Gram modifié) :

- a) Fixation par l'alcool éther.
- b) Coloration à froid, 2 à 3 minutes, par la solution de Ziehl.
- c) Action de solution bromo-bromurée, au lieu de la solution iodo-iodurée. De cette façon, le lavage suivant n'enlève pas la matière colorante.
- d) Mordantage énergique, 3 à 5 minutes, par l'acide chromique à 5 0/0.
- e) Lavages et décoloration à l'alcool acétone,

f) Coloration du fond par le bleu de méthylène.

Les bacilles sont colorés en rouge ; les condensations protoplasmiques qui se produisent dans les bacilles en chaines se trouvent colorés en rouge vif et le reste du microbe forme autour de ce point une sorte de gangue teintée en bleu pâle.

2° Caractères des bactéries.

La plupart des espèces isolées se colorent par le Gram et présentent leurs caractères normaux. Quelques-unes présentent des modifications particulières, notamment le *Bacillus bulgaricus*.

CHAPITRE V.

Bactéries de la fermentation lactique.

Nombreux sont les microorganismes produisant de l'acide lactique par transformation des matières sucrées ; leur histoire est des plus obscures.

On ne peut considérer comme ferment lactique un microbe ne donnant que de faibles quantités d'acide lactique, souvent trop minimes pour coaguler le lait ; c'est le cas du *Pneumocoque*, du *Streptococcus pyogène*, du *Staphylocoque doré* et de bien d'autres.

On ne peut même pas donner comme ferments lactiques véritables d'autres microbes qui en produisent plus, comme *Colibacille*, *Pneumobacille*, *Bacillus lactis aerogenes*, pour lesquels le rendement en acide lactique est faible. Les ferments lactiques vrais sont des microbes qui déterminent une fermentation lactique proprement dite, caractérisée par une transformation de 90-95 % du sucre présent. On peut admettre des rendements inférieurs, à la condition qu'ils restent importants, pratiquement utilisables.

PASTEUR a montré que la fermentation lactique dite normale était due au *B. lacticus* Pasteur ; depuis, LISTER, en 1878 (1), annonça la pluralité des ferments lactiques.

(1) LISTER. — On the lactic fermentation and its bearing on pathology (*Transact of the pathol. Society*, XXIX 1878).

Il existe en effet un grand nombre d'espèces bactériennes de la fermentation lactique : dans le lait, le fromage, le képhir, le yoghourt, le mازan, le moût, la bière et l'intestin ; toutes sont peu définies, non classées et constituent le groupe des « *Bactéries de la fermentation lactique* ».

Citons : *Bacillus acidophilus* de Finkelstein, isolé des selles des nourrissons, à côté des *B. bifidus*, *B. acidophilus* du *Bacille de Boas* Oppler, trouvés également dans les selles des nourrissons.

Bacillus Delbrücki Leichmann, le plus fréquent de la fermentation du malt et de l'orge, transforme le glucose et le saccharose en acide lactique gauche : le *B. lactis acidis* de Leichmann, très voisin, transforme le lactose en acide lactique. *Bacterium Casei* L. et N. a été isolé du fromage. Pour RODELLA, toutes ces espèces seraient identiques. Un certain nombre d'espèces ont été isolées du Yoghourt ; ce sont : *Bacterium granulosum* L. et N., *Bacterium Mazun* Duggelli, *Bact. Sardono* Grixoni, *Streptobacillus lebenis* Rist. et enfin le plus actif des ferments lactiques le *Bacillus bulgaricus* Luerissen et Kuhn.

Du képhir ont été également isolées un grand nombre d'espèces : *Lactobacillus caucasicus* Beijerinck, *Dispora caucassica* Kern.

Enfin VAN STENBERGE (1) vient de publier une remarquable étude sur les microbes lactiques, les espèces se rencontrant dans les industries de la fermentation alcoolique, notamment dans la distillerie et dans la brasserie.

En dernière analyse, c'est BEIJERINCK (2) qui a distingué la classe des microbes lactiques actifs, en prenant pour base la série des caractères généraux suivants :

(1) VAN STENBERGE. — Les propriétés des microbes lactiques. Leur classification. *Ann. Institut Pasteur*, 1920, page 803, 870 fig.

(2) BEIJERINCK. — Sur les ferments lactiques de l'industrie. *Arch. néerl. des Sc. ex. et natur.*, 1901

Id. — Fermentation lactique dans le lait. *Arch. néerl. des Sc. ex. et natur.*, 1907, page 357.

- 1° Ils sont immobiles.
- 2° Ils constituent des anaérobies facultatifs.
- 3° Ils ne forment pas de spores.
- 4° Ils exigent comme nourriture des hydrates de carbone déterminés et de l'azote peptonisé ou de préférence tryptonisé.
- 5° Ils forment de petites colonies sur milieu solide, même sur leur milieu préféré, le moût gélosé ou gélatiné, alors que dans l'extrait de Malt liquide la quantité de bacille produit est plus grande.
- 6° Ils forment, au dépens des sucres, soit de l'acide lactique, soit en plus une dose d'acide volatil et des doses toujours proportionnelles à ce dernier, d'alcool et d'anhydride carbonique.
- 7° Ils sont dépourvus de catalase, incapables de décomposer l'eau oxygénée (caractère spécifique).

Quant aux espèces rencontrées le plus souvent dans le lait à l'état naturel, ce sont les *Bacillus lacticus* et le *Streptococcus acidi lactici* Grotenfeld.

Nous donnons ci-après la diagnose des véritables espèces lactiques, isolées dans nos analyses et celles des espèces saprophytes les accompagnant, se rapportant à la liste suivante :

- 1° *Bacillus lacticus* Pasteur.
 - 2° *B. bulgaricus* Luerksen et Kuhn.
 - 3° *B. mesentericus Vulgatus* Flugge.
 - 4° *B. mesentericus ruber* Globig.
 - 5° *B. subtilis* Cohn.
 - 6° *B. bifidus* Tissier.
 - 7° *Streptococcus acidi lactici* Grotenfeld.
 - 8° *Bacillus caucasicus* (*Dispora caucassica*) Kern.
-

CHAPITRE VI.

Description des espèces isolées des préparations lactiques.

I. — *Bacillus lacticus* Pasteur.

Morphologie. — Eléments en batonnets courts, immobiles, épais de $1\ \mu$ 7, long de 0,6 à 2 et 3 μ . Eléments isolés, 2 par 2 ou en chaînette courte ; pas de spores.

Coloration. — Se colore par les couleurs d'aniline, prend le Gram.

Cultures. — Aérobie. Se cultive sur tous les milieux.

GÉLATINE. — *En plaque* : En 36 à 48 heures, petites colonies grises porcelanées, qui s'étalent à la surface, bords sinueux, transparents, centre opaque qui devient un peu jaunâtre. — *En pique* : Dans le canal, petites sphères et à la surface culture grisâtre luisante. — *En stries* : petites colonies circulaires, confluentes, formant une bande blanchâtre crémeuse.

GÉLOSE. — Bande laiteuse, très luisante ; il apparaît toujours des bulles de gaz dans la masse.

POMME DE TERRE. — Culture crémeuse, d'un blanc jaunâtre, assez épaissie.

BOUILLON. — Trouble rapide, voile blanchâtre, fragile en surface.

LAIT. — A + 28° coagule en 18 à 24 heures, masse gélatineuse homogène avec canalicules. Bulles gazeuses dans la masse.

CASÉINE. — Pas modifié. (Pas d'action peptonisante).

MILIEU SACCHAROSÉ, TOURNESOLÉ. — Rougit rapidement par production d'acide lactique.

INOCULATION AU COBAYE. — Cette espèce serait pathogène, d'après WURTZ et LINDET (1).

II. — *Bacillus bulgaricus* Grigoroff.

Morphologie. — Le bacille bulgare est un très gros bacille de 2 à 20 μ en chaînes à plusieurs articles, ce qui lui donne l'aspect du Bacille charbonneux. Immobile, dépourvu de capsule, il est indifféremment aérobie ou anaérobie. Dans les cultures de plusieurs jours, le protoplasma se condense au milieu de chaque article, ce qui donne à ce bacille l'aspect de gros streptocoque. Pas de spores.

Dans nos cultures, le *Bacillus bulgaricus* Grigoroff, se présente en éléments bacillaires courts, trappus, présentant de nombreuses formes d'involution; parfois le bacille se prolonge en une chaînette d'éléments courts, granuleux, ou bien ce sont de longues chaînettes de 15 à 20 éléments, présentant tous les caractères des *Streptococcus*, ou mieux des *Streptodiplococcus*, les articles ovoïdes étant souvent étranglés en leur milieu.

Coloration. — Prend le Gram.

(1) WURTZ et LINDET. — Recherche sur l'action pathogène du Bacille lactique. *Arch. Méd. exp.*, T. III, p. 485, 1891.

Cultures. — Dans les milieux usuels, sa végétation est pauvre, gélatine sucrée. Pas de cultures.

GÉLOSE. — Petites colonies d'un millimètre de diamètre, blanches, en lentilles épaisses et ombiliquées dans la zone anaérobie. Dans la zone aérée, petits flocons givrés assez denses très caractéristiques.

GÉLOSE EN PLAQUE. — Petites colonies givrées très petites, souvent ombiliquées.

BOUILLON. — Cultive très mal.

SÉRUM PEPTONISÉ. — (Peptonisé à 1,5 % de peptone Witt ou Chapoteaux). Se conserve vivace même après le 20^e jour, avec ce liquide on peut préparer la gélose solidifiée.

LAIT. — Coagulé en bloc vers la 18^e heure à 37°, le caillot n'est pas redissout, les graisses du lait sont altérées et saponifiées, ce qui donne un goût de suif désagréable caractéristique.

SÉRUM DE LAIT. — Préparé ainsi : Faire bouillir le lait 5 minutes, ajouter au lait bouillant 1 cm³ d'acide chlorhydrique par litre; on sépare la caséine précipitée. Le sérum est alcalinisé; on ajoute 300 gr. d'eau, 3 gr. de gélatine, 15 gr. de sucre de canne pour un litre. Stériliser à 115°, filtrer et stériliser de nouveau après répartition. Culture abondante au 2^e jour, les bactéries se conservent vivantes plus d'une semaine à la température du laboratoire.

Pathogénicité. — Espèce inoffensive pour l'homme.

III. — **Bacillus mesentericus vulgatus** Flugge.

Synonyme. — *Bacillus mesentericus*.

Aspect microscopique. — Bâtonnets grêles, arrondis de 0,8 à 2,4 μ de long, sur 0,7 à 0,9 μ de large. Parfois,

longs filaments. Tendance à la formation de spores arrondies de $1,5\ \mu$ de large sur $2\ \mu$ de long.

Mobilité. — Mouvements lents.

Coloration. — Gram positif.

Cultures. — Aérobic strict, optimum à 22° .

GÉLATINE. — *En plaque* : Colonies blanches, humides, puis dès le 3^e jour elles s'enfoncent. A un stade jeune, vues à un grossissement de $1/60$, comme des colonies de levures. Ressemblent parfois à celles du *B. mesentericus* L. et N, avec périphérie transparente, milieu transformé en godet. — *En pique* : Liquéfaction infundibuliforme, puis cylindrique, très lente. Zone liquéfiée trouble, au fond dépôt gris sale. — *En surface* : Enduit gris brillant, net, plissé, bien limité, peu saillant, mince, odeur de triméthylamine.

POMME DE TERRE. — Enduit blanc sale, humide, brillant, visqueux, bord mal délimité, plus tard très saillant, plissé, blanc jaune sale.

BOUILLON. — Trouble, puis clair, avec dépôt granuleux, pas de gaz, pas d'indol, un peu d'hydrogène sulfuré, voile à mailles larges ou membrane épaisse aréolée.

LAIT. — Se coagule, puis le coagulum se dissout en partie. Il se forme toujours des traces d'acide lactique.

IV. — **Bacillus mesentericus ruber** Globig.

Morphologie. — Bâtonnets de $2,5\ \mu$ de long, de $0,8\ \mu$ d'épaisseur ; peu mobiles, le plus souvent unis par 3 ou 4, bout à bout. Spores ovoïdes plus larges que le bâtonnet.

Coloration. — Gram positif.

Cultures : Sur gélatine. — *En plaque* : En 48 heures, petites taches circulaires, granuleuses, à centre jaunâtre, périphérie transparente. Au 3^e jour, les bords donnent des houppes en tous sens (apparence d'oursin). Liquéfaction au 5^e jour ; au 8^e, tout est liquéfié. — *En pique* : Liquéfaction 4^e jour. Entonnoir qui gagne la profondeur, le liquide est troublé de flocons grisâtres, formant un dépôt nuageux.

GÉLOSE. — A 35°, développement rapide en 16 heures ; culture blanc sale ou rose. La culture se plisse et devient rosée, elle n'adhère pas à la gelée.

POMME DE TERRE. — En 24 heures, culture blanc rose, à contour sinueux. Devient membraneuse et se plisse. Sur les vieilles cultures, teinte gris rougeâtre, sale ; odeur de jambon cuit. Matière colorante insoluble dans alcool et éther.

BOUILLON. — En 12 heures, voile épais ; liquide ne se trouble pas, mais brunit.

Pathogénéité. — Négative.

V. — *Bacillus subtilis* F. Cohn.

Synonymes. - *B. armoraciæ* Burchard ; *B. idosus* Burchard ;
B. mesentericus Burchard.

Morphologie. — Bâtonnets courts (1,2 à 3 μ), épais (0,8 à 1,2 μ). Extrémités arrondies, souvent en chaînette ou filaments.

Spores. — Ovale, germent perpendiculairement à leur axe.

Mobilité. — Actif, cils nombreux, longs peritriches.

Colorations. — Prend le Gram.

Cultures. — Aérobie.

GÉLATINE. — *En plaque* : Colonie s'enfonçant dans une zone de liquéfaction cupuliforme, au centre colonie frangée qui se désagrège. — *En pique* : En 36 heures, cupule à contenu grisâtre, contenant des grumeaux blanchâtres. A la longue, liquéfaction en cylindre ; à la surface, pellicule blanche, épaisse, plissée

GÉLOSE. — Couche brillante, humide, à bord uni, sail-lante, gris sale, pellicule avec plis radiaires. Eau de condensation trouble, sédiment gris nuageux.

BOUILLON. — Trouble, homogène, le milieu devient transparent, puis voile en surface, plissé résistant.

POMME DE TERRE. — Enduit blanc sale ou jaunâtre, bords ondulés, festonnés, saillants.

LAIT. — Coagulé, sans formation d'acide par produc-tion de présure, caillot non attaqué.

Espèces voisines. — *B. leptosporus* L. Klein, et *B. sessilis* L. Klein.

VI. — **Bacillus caucassicus** Kern.

Morphologie. — Courts bâtonnets cylindriques de 3,2 à 8 μ sur 0,8 μ de large, réunis en zooglées. Ils sont immo-biles dans les zooglées, à mouvements vifs dans le liquide. KERN leur a décrit des cils vibratils. On trouve aussi de longs filaments de 10 μ et plus de longueur, aérobies. Spores sphériques de 1 μ de diamètre ; nous avons nous-

même observé qu'il s'en formait à chaque extrémité, les bâtonnets ont alors la forme d'haltères. C'est pour ce caractère que cette espèce portait autrefois le nom de *Dispora caucassica*.

Coloration. — Se colore bien par le Gram.

Cultures. — BOUILLON. — Culture abondante, dépôt blanc grenu pas de voile en surface.

MILIEUX SUCRÉS. — Cette espèce se cultive bien sur tous les milieux sucrés produisant dans les milieux lactosés un peu d'acide lactique (1).

GÉLATINE. — En surface, colonies rondes de 1 millimètre, à bords très légèrement dentelés. En profondeur, culture maigre dans la strie d'ensemencement; elle s'étend très peu en surface.

GÉLOSE. — Couche grise, sèche, s'étendant difficilement.

LAIT. — Culture rapide : production d'un peu d'acide lactique.

VII. — *Bacillus bifidus* Tissier (2).

Morphologie. — Bâtonnets polymorphes, minces, effilés, long de 4 μ immobiles. Isolés ou par deux ; on observe aussi des formes en massues, courbes ou bifurquées. Pas de spores.

(1) KRANNHALD. — Ueber das kumysahnliche Getränk Képhir A. *Deutsche aschu für Klin Méd.*, 1884.

(2) TISSIER. — Recherche sur la flore intestinale, normale et pathologique du nourrisson Thèse, Paris, 1901.

Coloration. — Reste coloré par le Gram d'une façon un peu irrégulière.

Cultures. — Anaérobie strict. Végète à 37°, lentement à 20°.

GÉLOSE. — *Gélose ordinaire* : Pas de culture. — *Gélose glucosée*: Après trois jours, deux sortes de colonies : 1° Grosses, deux millimètres, lenticulaires, à bords nets, blanchâtre prolongement sur une des faces ; 2° petites, ovoïdes, celles à formes géantes ne donnent pas de gaz.

BOUILLON. — Trouble en trois jours ; masses floconneuses au fond.

LAIT. — Coagulé. Le coagulum ne se redissout pas.

SUCRES. — Tous fermentent, surtout glucose, lactose, saccharose, donnent de l'acide lactique inactif et acide acétique.

L'acidité d'arrêt est de 4,90 dans les milieux glucosés ou lactosés, à 3,43 dans les milieux saccharosés, acidité exprimée en acide sulfurique.

Action. — Non pathogène, arrête les fermentations putrides intestinales.

VIII. — *Streptococcus acidilactici* Grotenfeld.

Synonymes. — *Bacterium lactis acidilactici* Leichmann ; *Bacterium Guntheri* L. et M. ; *Bacillus lacticis* Kruse ; *Bacillus acidilactici paralactici* Kozai.

Morphologie. — Courts bâtonnets, présentant l'aspect de gros coccus ovalaires, de 1 μ de long sur 0,5 à 0,6 μ d'épaisseur, groupés par deux ou en petites chaînettes, effilés en pointe ou arrondis aux pôles.

Colorations. — Prend le Gram.

Cultures. — Non mobile. Aérobic facultatif.

GÉLATINE. — *En plaques*: Colonies punctiformes 0,55, plus grosses en milieux sucrés, très délicates, pas de liquéfaction. — *En pique*: Colonies seulement dans la profondeur.

GÉLOSE. — Dépôt transparent en fines gouttelettes de rosée, colonies plus épaisses sur agar sucré. Sur la gélose sucrée transparente, colonies entourée d'un halo trouble.

POMME DE TERRE. — Culture maigre.

BOUILLON. — Non sucré, léger trouble. Sucré, trouble manifeste, pas de pellicules.

LAIT. — Coagulé, réaction acide, coagulum solide. Production d'acide lactique droit, pas de gaz.

MILIEUX SUCRÉS. — La maltose, la saccharose, l'arabinosé, la mannite, la glycérine fermentent aussi plus ou moins selon les races.

Pouvoir pathogène. — Manque, légère par passages répétés.

Habitat. — Agent le plus fréquent de la fermentation lactique.

Isolement. — Pour l'isoler du lait ou des cultures des produits lactiques, employer les milieux additionnés de lactose et de craie. Il se forme des champs clairs, autour des colonies productrices d'acides,

IX. — Levure du Képhir.

La levure isolée se colore bien par le Gram. Par sa taille et ses caractères morphologiques et de culture, elle se rapproche de *Saccharomyces cerevisiæ*.

Il semble donc que, dans certaines préparations de comprimés lactiques, on introduise directement des grains de Képhir. Dans quelques cultures, provenant de l'ensemencement de ces comprimés, nous avons trouvé réunis : Levure, *Dispora caucassica* et bacilles voisins de *Bacillus bulgaricus* Kuntze.

CHAPITRE VII.

Etudes chimiques des préparations lactiques.

Il importait de savoir par la recherche et le dosage de l'acide lactique produit par la culture, si les comprimés examinés contiennent assez de bacilles vivants, au moment de l'analyse, pour pouvoir établir dans l'intestin une fermentation lactique.

Dans les bouillons de culture ensemencés nous avons recherché :

- 1° La présence de l'acide lactique ;
- 2° La quantité produite rapportée au litre de culture ;
- 3° La présence de l'acide lactique préexistant en nature dans les comprimés.

Divers procédés ont déjà été donnés pour exécuter le dosage de l'acide lactique produit par fermentation. Nous exposons ci-après les méthodes employées par nos devanciers. Remarquons que le mode d'essai le plus simple des ferments lactiques, qui consisterait à ensemencer du lait, donnerait des résultats fantaisistes. En effet, additionné d'un bouillon acide, même stérile, le lait se coagulera plus ou moins vite, par son séjour à l'étuve. Encore le résultat dépendra-t-il de l'état du lait, avant sa stérilisation. La réaction de ce liquide est en effet des plus variables.

Méthodes de dosage.

I. — Dosage de l'acide lactique par extraction à l'éther.

Cette méthode longue et difficile s'effectue ainsi : on ajoute, à un ballon de bouillon de 1 litre $1/2$, 2 à 5 % de glucose ou lactose et 10 grammes de carbonate de chaux. La chaux se combine avec l'acide formé et l'acide carbonique se dégage. Après quelques jours, on filtre pour séparer le carbonate insoluble. Ce dernier est acidifié fortement avec l'acide phosphorique et on distille à l'aide de la trompe à eau les acides volatils. La distillation est longue et la séparation complète des acides volatils difficiles. L'acide lactique (et, s'il y en a succinique), non volatil, reste dans le résidu de cette distillation. On isole en agitant fortement le liquide avec de l'éther et on distille ensuite l'éther.

II. — Méthode de Bertrand et de Weisweiller (1).

Méthode exposée à propos de l'action du *Bacillus Bulgaricus* sur le lait, maintenu à l'étuve 48 heures à 29°.

On opère sur 100 grammes de lait.

a). Dosage de l'acidité.

On prélève 20 grammes de lait qu'on pèse dans un petit matras et qu'on titre en présence de phthaléine, avec la liqueur de soude $1/5$ N.

(1) BERTRAND (G.) et WEISWEILLER (G.). — Action du ferment Bulgare sur le lait *Ann. Inst. Pasteur*, 1906, page 976.

L'acide lactique, formé par le microbe, existe à l'état d'acide réel et en partie sous la forme d'éther lactyllacétique ; il faut tenir compte de ce dernier.

L'éther lactyllacétique prend naissance spontanément par réaction mutuelle de deux molécules d'acide, de sorte que l'acidité de cet éther représente seulement la moitié de celle de l'éther lactique dont il est formé ; en milieu alcalin l'éther s'hydrate très aisément et produit les deux molécules d'acide lactique.

b). *Mode opératoire.*

Lorsque le titrage a permis de saturer l'acidité libre du lait, on ajoute un excès de la solution de soude (5 cm^3) ; on abandonne le matras bouché à la température ordinaire pendant une demi heure ; la saponification de l'éther lactyllacétique est alors accomplie. Il ne reste plus qu'à déterminer avec l'acide sulfurique $1/5\text{ N.}$ la quantité de soude qui reste en excès. Tout ce qui a été employé de cet alcali, déduction faite de l'acidité primitive du lait, représente la totalité des acides qui ont pris naissance au cours de la fermentation.

La quantité d'éther lactyllacétique ne représente guère que quelques centièmes de l'acidité libre.

On doit faire le titrage de l'acidité avec beaucoup d'attention, car les virages de teintes ne sont pas d'une grande netteté ; l'erreur maxima de lecture est de $0,25\text{ cm}^3$ de liqueur de soude, correspondant à $0,045$ d'acide lactique pour 100 gr de lait.

Comme la matière protéique fixe de la phtaléine, on est forcé, vers la fin du titrage, d'ajouter de la phtaléine à différentes reprises, afin d'être sûr qu'il y en a en solution.

III. — Méthode de Bouvet (1).

Dosage de l'acide lactique par méthodes acidimétriques usuelles. Procédé Donic, titrage par solution de soude à 4 gr.,445 par litre, $1\text{ cm}^3 = 0,010$ d'acide lactique. Prise d'essai 10 cm^3 de lait indicateur 3 gouttes de solutions alcooliques de phénolphtaléine à 1 %.

Le nombre de dixièmes de centimètre cube lu sur la burette donne en degrés Donic l'acidité du lait.

Technique. — Dans la soirée on place dans des verres à expérience cylindriques, identiques comme forme et comme épaisseur, 100 grammes de lait préalablement stérilisé 30 minutes à 125° et refroidi ; puis, étiquetant soigneusement chaque vase, 1 gr. des ferments à essayer. Un autre vase contenant 100 cm^3 de lait stérilisé servira de témoin. Les verres sont laissés toute la nuit à la température du laboratoire (18° environ). Le lendemain, on dose de temps en temps ; l'acidité dans la soirée, on est en possession de résultats précis.

IV. — Procédé de Bellet.

Ce procédé repose sur la décomposition de l'acide lactique avec production d'aldéhyde éthylique sous l'action du permanganate de potasse en solution alcaline chaude. Les vapeurs sont reçues dans une solution titrée d'azotate d'argent ammoniacal. Elles sont entraînées par un courant d'air à travers le réactif ; de la diminution du titre de cette dernière, on déduit aisément la quantité d'acide lactique qui se trouvait dans la prise d'essai.

(1) BOUVET (M.). — *Bulletin des Sciences pharmacologiques*, 1913, p. 483.

V. — Dosage de l'acide lactique par pesée de la chaux dissoute par l'acide lactique de fermentation formé.

Chaque examen comportera deux ballons :

- a) Témoin dans lequel on dose la chaux dissoute ;
- b) Un ballon ensemencé et mis en culture pendant 48 heures à 37°.

Les cultures faites sur 100 c³ de bouillon de touraillon (Bouillon BERTRAND) (1) additionné de 5 gr. de carbonate de chaux et stérilisé, sont ensemencés avec un comprimé ou 1 cm³ de liquide à examiner.

On place à l'étuve à 37° pendant 48 heures et l'on a soin d'agiter de temps en temps, toutes les deux ou trois heures, pour faciliter la dissolution de la chaux.

La culture, pendant ce temps, doit prendre un aspect trouble homogène, sans formation de voile gris verdâtre montant à la surface. Lorsqu'on viendra de faire un nouveau bouillon, on aura soin de placer en même temps à l'étuve un ballon non ensemencé pendant le même temps 48 heures, car même dans les bouillons stériles la chauffe prolongée provoque une certaine acidité qui dissout une petite quantité de chaux qu'il faudra déduire de la quantité totale produite par la culture du ferment. Il n'est nécessaire de faire cet essai qu'une seule fois, avec chaque bouillon nouveau.

Dosage de l'acide lactique formé. Après les 48 heures de culture, on filtre et l'on précipite la chaux dissoute dans 20 cm³ de filtrat (40 cm³ pour le témoin) par une solution concentrée d'oxalate d'ammoniaque, d'ammoniaque et de chlorhydrate d'ammoniaque.

On porte à l'ébullition pendant quelques instants ; on

(1) BERTRAND (G.). — *Annales de l'Institut Pasteur*, page 404, 1909.

laisse refroidir une demi journée et l'on filtre le précipité obtenu sur un petit filtre de 8 cm. de diamètre sans cendres ; on lave le précipité avec de l'eau distillée, deux ou trois fois, sans s'inquiéter si tout l'oxalate d'ammoniaque est éliminé, ce qui n'est d'aucune importance puisqu'on calcine ensuite le précipité.

On calcine le précipité obtenu dans une capsule de platine préalablement tarée et l'on pèse après refroidissement le poids de chaux obtenu ; soit Y ce poids et d'autre part le poids de chaux obtenu avec 40 cm³ du témoin étant Z, on aura :

$$\text{Poids de chaux : } (Y \times 5) - (Z \times 2,5) = Q.$$

A l'aide de cette quantité de chaux vive on calculera la quantité d'acide lactique pour mille en appliquant la formule :

$$Q \times 3,2142 \times 10 = \text{Acide lactique.}$$

Le coefficient 3,2142 est le rapport $\frac{\text{Acide lactique}}{\text{Chaux}}$

Cette méthode offre des inconvénients ; si la calcination est modérée, on aura un mélange de chaux et de carbonate de chaux. Pour avoir un produit défini, on pourra ajouter sur le produit un peu de solution de carbonate d'ammoniaque, évaporer puis chauffer sans dépasser le rouge très-sombre. On pèse du carbonate de chaux. On pourrait aussi transformer le résidu en sulfate et calciner au rouge naissant. Pour un chimiste exercé, une calcination violente permet de peser de la chaux vive (CaO).

Facteurs numériques pour les calculs :

Chaux vive $\times 3,2142 =$ Acide lactique dans la prise d'essai.

Sulfate de chaux $\times 1,32 =$ Acide lactique dans la prise d'essai.

Carbonate de chaux $\times 1,80 =$ Acide lactique dans la prise d'essai.

Les difficultés énoncées nous ont engagé à établir la méthode de dosage suivante applicable dans tous les cas :

VI. — Méthode personnelle.

1° Milieu de culture employé.

Nous avons employé le bouillon de Touraillon dont nous avons donné précédemment la formule, toujours *employé dès sa préparation*.

2° Ensemencement.

Pour chaque échantillon de produit sec on sème 0,50 de comprimés ou 0,50 de poudre, correspondant tantôt à un, tantôt à deux comprimés, dans 100 cm³ de bouillon de Touraillon contenant 3 gr. de carbonate de calcium. Pour les préparations liquides 1 cm³ de bouillon à analyser. Chaque ballonensemencé avec les comprimés préalablement pulvérisés, la poudre ou le liquide, est maintenu 48 heures à l'étuve à 37°. On a soin d'agiter de temps en temps, toutes les trois ou quatre heures, de manière à donner une culture plus uniforme. Lorsque les 48 heures de culture sont écoulées, les ballons sont chauffés 10 minutes à l'ébullition, pour coaguler les matières albuminoïdes, puis filtrés. Le chauffage diminue un peu la quantité de carbonate de chaux, mais le même dosage est opéré sur un ballon témoin, les résultats sont comparables, d'autant qu'une partie de la chaux a pu être dissoute par l'autoclave, indépendamment de celle dissoute par l'acide lactique produit.

Sur chaque ballon on procède aux opérations suivantes.

1° Recherche qualitative de l'acide lactique.

2° Dosage de ce dernier.

A. — *Recherche qualitative de l'acide lactique.*

Sur le liquide de culture relativement peu coloré par les méthodes suivantes :

a) *Par le réactif d'Uffelmann :*

Eau phéniquée à 4/100.....	20 cm ³
Perchlorure de fer.....	1 goutte.

Dans un petit verre à expérience 10 cm³ de réactif sont additionnés de V à X gouttes de bouillon de culture. La réaction positive donne une couleur jaune dont l'intensité varie avec la force de la réaction.

b) *Par la réaction de l'iodoforme.* — Un centimètre cube de bouillon est additionné de 1 cm³ de solution iodo-iodurée. On ajoute un peu de soude. La réaction varie depuis la production d'odeur d'iodoforme, jusqu'à la formation d'un précipité abondant. Dans les cas douteux on pourra s'assurer que l'on a bien à faire à l'acide lactique de la façon suivante : On précipite la chaux du lactate de chaux à l'aide de l'acide sulfurique dilué, on filtrera et l'on traitera le filtrat par l'éther. On évaporera l'éther à basse température et sur le résidu, on pourra faire les réactions caractéristiques de l'acide lactique, comme précédemment : par la réaction de Berg au perchlorure de fer, etc. On les obtient d'ailleurs très facilement avec les bonnes cultures.

La réaction de l'iodoforme est la plus constante et concordante. Dans certains cas où l'acide lactique est abondant, la réaction d'Uffelmann était parfois faible, tandis qu'un abondant précipité d'iodoforme était obtenu.

La réaction d'Uffelmann, par contre, a toujours été faible, lorsque la réaction de l'iodoforme était à peu près nulle.

B. — *Méthode de dosage de l'acide lactique formé employée dans nos recherches.*

Les bouillons ont été additionnés de 3 gr. de carbonate de chaux pour 100 cm³, à mesure que l'acide lactique se produit par fermentation, il dissout le carbonate de chaux, en donnant du lactate de chaux soluble.

En sorte que la quantité de la chaux dissoute est équivalente au point de vue chimique à la quantité d'acide lactique produit.

Un dosage de la chaux dissoute conduira à la connaissance de la quantité d'acide lactique formé.

La chaux dissoute par l'acide lactique produit est précipité par l'oxalate d'ammoniaque et l'oxalate de chaux décomposé, donne de l'acide oxalique qui sera dosé par une solution titrée de permanganate de potasse.

A 50 cm³ de bouillon filtré et maintenu à l'ébullition, acidifié par 2 cm³ d'acide acétique, on ajoute 30 cm³ d'une solution décimale d'oxalate d'ammoniaque (7,50 par litre).

La chaux précipitée à l'état d'oxalate, est recueillie sur un petit filtre sans pli, on lave l'oxalate de chaux à l'eau froide ; puis après avoir percé le filtre, on entraîne la matière par un jet de pissette, dans une fiole conique. On lave le filtre d'abord avec 10 cm³ d'une solution d'acide sulfurique au 1/10, puis à l'eau pour entraîner les dernières traces.

L'acide sulfurique décompose l'oxalate de calcium. Il se forme du sulfate de calcium insoluble, tandis que l'acide oxalique mis en liberté reste dans la solution. Cette dernière trouble en raison de la présence du sulfate de chaux produit, est portée au bain-marie à 60°.

On dose alors dans la solution la quantité d'acide oxalique produit. On fait tomber goutte à goutte la solution décimale normale de permanganate de potasse (3,16 par litre) jusqu'à coloration rose, ne disparaissant pas par un nouveau chauffage au bain-marie.

On note le nombre de centimètres cubes employés.

Calculs. — L'expérience donne :

1° Le nombre de cm^3 de solution de permanganate de potasse employés pour doser la chaux dissoute, dans le ballon témoin non ensemencé.

2° Le nombre de centimètres cubes de solution de permanganate de potasse employés pour doser la chaux dissoute dans le ballon ensemencé ayant cultivé.

Sachant que 1 cm^3 de solution de permanganate de potasse = 0,009 d'acide lactique (1), la différence entre le nombre de centimètres cubes de solution de permanganate employés dans le ballon de culture et le nombre employé pour le ballon témoin multiplié par 0,009 donne pour 50 cm^3 de culture, la quantité d'acide lactique produit.

En multipliant par 20 on ramène facilement au litre.

Exemple : 1° témoin 3 cm^3 8 de permanganate.

2° culture 27,4.

$$27,4 - 3,8 = 23,6 \times 0,009 \times 20 = 4 \text{ gr.}, 248.$$

Acide lactique = 4 gr., 248 par litre.

(1) 1 centimètre cube de permanganate $\frac{N}{10}$ = 0 gr., 009 d'acide lactique.

Cela résulte de ce qu'un litre de permanganate normal oxyde un équivalent d'acide oxalique pesant 45 ($\frac{90}{2}$) et de ce que dans les réactions successives qui ont été employées au cours de l'analyse, cet équivalent d'acide oxalique s'est substitué vis-à-vis du calcium à son équivalent d'acide lactique pesant 90 ; les liqueurs titrées étant encore basées sur le système des équivalents.

C. -- *Recherche et dosage de l'acidité préexistante.*

L'examen chimique dont nous venons d'exposer les principales variantes devant être pratiqué, les fraudeurs n'ont pas manqué d'essayer d'en fausser les résultats.

Dans ce but, un certain nombre de produits sont additionnés d'un acide (acide lactique pour les cultures liquides, acide tartrique pour les comprimés).

Un ballon de 100 cm³ de Bouillon Bertrand, additionné de 3 gr. de carbonate de chaux, estensemencé avec 0,50 de comprimés ou poudre ou 1 cm³ de liquide. On porte à l'ébullition. Le dosage de l'acidité ne relèvera donc ici que l'acidité préformée du produit augmentée de l'acidité propre du milieu de culture.

CHAPITRE VIII.

Résultats des analyses des préparations à ferments lactiques.

I. — Produits secs.

Il est à signaler que durant les premiers mois, les préparations lactiques sèches donnent la même proportion d'acide. Au bout de quelques mois le chiffre produit baisse. Enfin elles peuvent, après un temps plus ou moins long, devenir tout à fait inactives.

A. — Comprimés.

1^{re} série. — Nous donnons ci-après les résultats des dosages exécutés sur une première série de 45 échantillons, représentant 22 marques commerciales, sans tenir compte des dates de fabrication.

Acidité lactique par litre, obtenue en 48 heures de culture :

N ^o 1.....	= 0,540	N ^o 8.....	= 0,288
— 2.....	= 4,518	— 9.....	= 0,036
— 3.....	= 2,214	— 10.....	= 0,576
— 4.....	= 0,774	— 11.....	= 0,378
— 7.....	= 0,648	— 12.....	= 3,078

N° 13.....	= 3,330	N° 29.....	= 1,566
— 14.....	= 0,090	— 30.....	= 0,702
— 15.....	= 0,090	— 31.....	= 5,256
— 16.....	= 0,090	— 32.....	= 3,618
— 17.....	= 0,270	— 33.....	= 6,066
— 18.....	= 5,274	— 34.....	= 5,796
— 19.....	= 5,40	— 35.....	= 5,176
— 20.....	= 1,656	— 36.....	= 0,036
— 21.....	= 1,368	— 37.....	= 3,834
— 22.....	= 5,310	— 38.....	= 5,40
— 23.....	= 6,372	— 39.....	= 6,246
— 24.....	= 3,204	— 40.....	= 1,826
— 25.....	= 5,346	— 41.....	= 4,22
— 26.....	= 0,216	— 42.....	= 5,526
— 27.....	= 3,330	— 43.....	= 0,188
— 28.....	= 0,756	— 44.....	= 4,248

N° 45 Comprimés belges = 28 gr.

2^e série. — Analyses exécutées systématiquement sur des échantillons venant d'être préparés et dont nous connaissions les dates de fabrication.

MARQUE	DATE de préparation	DATE d'analyse	QUANTITÉ d'acide lactique produit p. litre
A....	20 Août 1920	18 Novembre 1920	12,50
A....	Novembre 1920	18 Novembre 1920	1,70
B....	Novembre 1920	7 Janvier 1921	20,47
B....	10 Janvier 1921	13 Janvier 1921	31,60

3^e série. — Pour rechercher la durée de survie des ferments dans les comprimés et connaître la durée moyenne pendant laquelle ces ferments peuvent être utilisés, nous avons fait, en série, des analyses de comprimés de même provenance et de même date.

MARQUE	DATE de préparation	DATE d'analyse	QUANTITÉ d'acide lactique produit p. litre
D....	Avant Juin 1920	2 Juin 1920	30 gr.
	—	22 Juillet 1920	36,16
	—	16 Octobre 1920	32,75
	—	24 Novembre 1920	21,60
	—	13 Janvier 1921	29,50
E....	Avant Mai 1920	26 Juin 1920	27,83
	—	30 —	27,19
	—	22 Juillet 1920	34,72
	—	16 Octobre 1920	24,70
	—	24 Novembre 1920	11,13
	—	13 Janvier 1921	27,40

B. — Poudres.

L'analyse des poudres, avant la mise en comprimés, donne toujours plus d'acide lactique que le comprimé qui en résulte. A plus forte raison, lorsque les comprimés proviennent de dépôt de caséine, broyés, la méthode employée pour broyer la poudre étant toujours très violente.

Par contre, si les poudres non comprimées, paraissent plus actives au début, elles voient s'atténuer peu à peu leurs propriétés sous l'influence de l'air.

Nous avons vérifié ce fait sur une poudre de la marque A pour laquelle nous avons fait des analyses en séries, en prenant nos prises d'essais en surface, à un centimètre de la surface enfin au fond du flacon, profond de 6 centimètres.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Poudre A avant compression (ferments et lactose), ensemencement avec 0,30 poids d'un comprimé de la même marque.

DATE DE FABRICATION	DATE D'ANALYSE	ACIDE LACTIQUE FORMÉ		
		Prise de la poudre		
		en surface	à un centimètre de la surface	au fond
2 Novembre 1920	8 Décembre 1920	Néant	9,86	1
	Janvier 1921	Néant	7,18	12,85

Il résulte de cette constatation : 1^o que ces poudres devraient être conservées en tubes clos, à l'abri de la lumière ; 2^o qu'il y aurait peut-être intérêt à enrober les comprimés pour soustraire les ferments à l'action de l'air ; 3^o dans les expertises, il y aura lieu de faire un mélange homogène de la poudre, avant de prélever la quantité nécessaire aux ensemencements.

II. — Produits liquides.

Bouillons.

Les produits liquides produisent toujours plus d'acide lactique par litre, que les préparations sèches.

Nous donnons, ci-après, les résultats d'analyses pratiquées sur les bouillons de quelques marques pharmaceutiques, d'ailleurs, ces préparations sont rares, contrairement aux nombreuses marques de produits secs.

1^{re} Série.

N ^o d'analyse	Marque	Date de fabrication	Date d'analyse	Quantité par litre d'acide lactique produit en 48 h. par 1 cm ³ de bouillonensem.
N ^o 46	F		28 Décembre 1919	Néant
— 47	B	Novembre 1919	29 Décembre 1919	29,73
— 48	B	9 Février 1920	21 Février 1920	16,07
— 50	B	8 Avril 1920	16 Avril 1920	19,83
— 52	B	11 Mai 1920	21 Mai 1920	25,14
— 56	B	7 Octobre 1920	19 Octobre 1920	30,80
— 61	B	13 Décembre 1920	20 Décembre 1920	16,77
— 62	B	Novembre 1920	7 Janvier 1921	20,47
— 49	C	9 Avril 1920	14 Avril 1920	34,29
— 51	C	18 Avril 1920	30 Avril 1920	29,00
— 53	C	25 Mai 1920	2 Juin 1920	32,20
— 54	C	7 Juin 1920	17 Juin 1920	33,00
— 55	C	13 Juin 1920	26 Juin 1920	37,63
— 57	C	Novembre 1920	18 Novembre 1920	30,18
— 58	C	3 Décembre 1920	8 Décembre 1920	32,15
— 59	C	6 Décembre 1920	8 Décembre 1920	33,81
— 60	C	7 Décembre 1920	8 Décembre 1920	31,40

2^e série.— Analyses exécutées pour rechercher la durée moyenne de survie des ferments dans les milieux liquides. Comme pour les comprimés et les poudres, ces analyses ont été faites sur un même bouillon de marque déterminée.

MARQUE	DATE de fabrication	DATE d'analyse	QUANTITÉ d'acidelactique produit p. litre
C.....	16 Juin 1920	26 Juin 1920	35,87
		22 Juillet 1920	42,00
		16 Octobre 1920	33,40

Nous avons dû arrêter cette expérience, le bouillon représentant, en novembre, des moisissures accidentelles,

MARQUE	DATE de fabrication	DATE d'analyse	QUANTITÉ d'acidelactique produit p. litre
B 1 ^{er} flacon	12 Juillet 1920	22 Juillet 1920	24,33
		16 Octobre 1920	Néant

Deux essais successifs ont donné un résultat négatif.

MARQUE	DATE de fabrication	DATE d'analyse	QUANTITÉ d'acidelactique produit p. litre
B 2 ^e flacon	Juillet 1920	22 Juillet 1920	27,12
		16 Octobre 1920	23,12
		8 Novembre 1920	22,11
		Janvier 1921	21,22

CHAPITRE IX.

Quantité d'acide lactique exigée d'un produit considéré normal.

D'après les auteurs, le *Bacillus bulgaricus* (1), peut donner en 10 jours, à 35°, de 22 à 25 gr. d'acide lactique par litre et, jusqu'à 31,30 pour COHENDY (2), BECQUET (3) obtenait une moyenne de 5,5 en 5 jours à 35° avec la même espèce. BERTRAND, 25 à 30 gr. (4).

Il y aurait donc lieu pour les comprimés des ferments lactiques, de ne pas exiger la production de 10 gr. d'acide lactique par litre en 48 heures, comme le demande M. le Professeur GRIMBERT pour les bouillons. En exigeant de 4 à 5 grammes pour les poudres ou les comprimés, on se trouverait dans les bonnes moyennes. Encore, même les meilleures marques, seraient-elles à la merci d'une conservation défectueuse de comprimés devenus stériles, après quelque temps de préparation

Pour les préparations liquides, une culture doit fournir

(1) MACÉ. — *Traité de Bactériologie*, T. I, p. 453.

(2) COHENDY. — Essai d'acclimation microbienne persistante dans la cavité intestinale. *Compte-rendu Soc. Biolog.*, p. 364, 1906.

(3) BECQUET (M.). — Contribution à l'étude de l'action du Bacille bulgare sur la flore intestinale. *Thèse Ec. Ph. Paris*, p. 52-61, 1914.

(4) BERTRAND (G.) et WESSWEILLER (G.). — Action du ferment bulgare sur le lait. *Ann. Institut Pasteur*, p. 971, 1906.

un minimum de 10 grammes d'acide lactique par litre, après 48 heures à 37° et 1 cm³ d'ensemencement.

Le chiffre de 4 à 5 gr. d'acide lactique produit par litre de culture pour les poudres et les comprimés n'a pas été choisi à la légère. Il est basé sur la constatation suivante.

En ensemençant les comprimés sur le lait écrémé, on obtient, en 48 heures, une coagulation complète, sans que la surface présente ni boursouffure, ni trace de peptonisation, au moins pendant les 3 ou 4 premiers jours, car à la longue, le caillé se sépare et est surpagé par une légère couche de sérum, à ce moment le milieu contient de 5 à 6 gr. pour mille d'acide lactique.

On constate, en outre, qu'il n'y a pas de quantité notable d'acide butyrique, acétique ou d'alcool.

Tous les ferments lactiques vrais, donnent de l'acide lactique éthyliques se présentant sous deux formes stéréoisomères :

1° Acide lactique dextrogyre.

2° Un acide levogyre.

Parfois, il y a mélange des deux, molécules à molécules, et production d'acide lactique de fermentation, inactif sur la lumière polarisée.

Parmi les espèces que l'on peut rencontrer accidentellement dans les préparations lactiques médicinales, très peu sont productrices d'acide lactique ou lorsqu'elles en donnent, la proportion est infinitésimale, ainsi le *Bacillus lactis ærogenus* donne, avec le glucose, toute une série de produits, parmi lesquels figure à peine pour un dixième l'acide lactique.

La fermentation qu'il détermine ressemble beaucoup à celle du *Bacillus coli-communis*, qu'il accompagne dans les fèces. Ni l'un ni l'autre de ces deux microbes, ne sont, à proprement parler, de véritables ferments lactiques.

Tous les ferments lactiques vrais, que ce soit le *Bacillus*

bulgaricus, le képhir ou les espèces produisant la fermentation des laits indigènes, contiennent une lactase. Cette dernière est sans doute fixée au corps du microbe, en tout cas on n'en peut trouver dans le milieu de culture, filtrée à travers une bougie de porcelaine, c'est une endo-lactase.

Dans les essais des comprimés pharmaceutiques : 5 gr. de comprimés ensemencés doivent produire, en 48 heures, 5 à 6 gr. d'acide lactique par litre de culture. Cette quantité d'acide lactique est d'ailleurs la proportion nécessaire à la coagulation d'un litre de lait écrémé.

Pour les préparations de ferments liquides, on devra obtenir, dans les mêmes conditions de cultures, 10 gr. d'acide lactique par litre.

(1) HARDEN et WALPOLE.— *Proceedings of the Royal Society*, T. LXXVII, p. 399, 1906.

CHAPITRE X.

Protocole d'expérience pour l'expertise d'une préparation médicinale à ferments lactiques.

1° *Examen microscopique simple.* — Détermination des amidons pour les comprimés, etc.

2° *Examen microscopique après coloration bactériologique simple et par le gram modifié.* — Recherche des espèces bactériennes, champignons (peuvent être visibles ou non).

3° *Examen chimique direct.* — Recherche du glucose, du lactose, de l'acide lactique, tartrique, en nature.

4° *Culture en bouillon de Touraillon, 48 heures de culture à 37°.* — Ensemencement de deux ballons 0,50 de comprimés ou 1 cm³ de préparation liquide pour 100 cm³ de bouillon additionnés de 3 gr. de carbonatè de chaux.

5° *1^{er} ballon.* — *Examen bactériologique, étude des espèces isolées par cultures sur plaques.*

6° *2^e ballon.* — *Recherche et dosage de l'acide lactique produit.*

7° *Conclusions.*

Le chiffre d'acide lactique par litre obtenu, pour 48 heures de culture à 37°, doit toujours se tenir aux environs de 5 gr. pour les préparations sèches ; 10 gr. pour les préparations liquides.

CHAPITRE XI.

CONCLUSIONS.

Parmi les préparations lactiques à l'état sec examinées les unes sont stériles, les autres renferment des espèces banales (*Bacillus subtilis* ; *B. megaterium*) ; d'autres étaient constituées par des espèces lactiques (*Bacillus Bulgaricus*, *Streptocoques lactiques*, *Bacillus lacticus*) seuls ou associées à des levures (*képhir*, *Bacillus caucasicus*).

BERTRAND et BERTHELOT y ont en outre observé *B. bifidus* voir même *Bacillus perfringens* et M. le Professeur GRIMBERT nous a dit y avoir observé *Bacillus coli-communis*.

Les préparations liquides sont presque toujours fertiles, presque toutes renferment des symbioses de *Bacillus bulgaricus* et de *Bacilles lactiques*.

Il y a toujours eu concordance entre les résultats bactériologiques et la quantité d'acide lactique produit.

Les comprimés ne renfermant que *Bacillus subtilis* ou *Bacillus mesentericus*, ne produisent que des doses infimes d'acide lactique, parfois en quantités telles que ce chiffre peut être considéré comme erreur d'expérience (acide lactique par litre, formé en 48 heures :

N° 30 = 0,702 N° 26 = 0,216 N° 14 = 0,090.

Il importait de savoir par la recherche et le dosage de l'acide produit par la culture, si les comprimés examinés contiennent assez de bacilles vivants, au moment de l'analyse, pour pouvoir établir dans l'intestin une fermentation lactique.

Pour les produits secs, les 46 échantillons examinés ont donnés les résultats suivants :

10	variétés de comprimés, moins de 0,50 d'acide lactique par litre en 48 h.					
6	—	—	—	de 1 gram.	—	—
4	—	—	—	1 à 2 gram.	—	—
1	—	—	—	2 à 3 gram.	—	—
6	—	—	—	3 à 4 gram.	—	—
3	—	—	—	4 à 5 gram.	—	—
9	—	—	—	5 à 6 gram.	—	—

Mais ce sont les comprimés contenant les mélanges de ferments normaux *Bacillus lacticus*, *Bacillus bulgaricus*, *Streptocoques lactiques* qui donnent le maximum de rendement.

3 variétés de comprimés donnent plus de 6 grammes par litre d'acide lactique en 48 heures. Une préparation belge a donné 28 grammes par litre et deux françaises 27 et 31 grammes,

Ayant analysé, plusieurs fois la même marque, il n'est pas sans intérêt de signaler que certaines se classent dans différentes catégories, suivant leur ancienneté en raison de la mauvaise conservation vitale des bactéries ou du nombre variable d'individus restés vivants.

Ainsi un des ferments, dont quelques comprimés ne donnent que 1,36 d'acide lactique, produit 4 grammes pour d'autres échantillons ; une autre marque parfois stérile produit souvent jusqu'à 6 grammes d'acide lactique par litre.

Pour les milieux liquides, ou bien les cultures sont tout à fait stériles, cas excessivement rare, ou bien on peut isoler :

1° Le *Bacillus Bulgaricus* à l'état pur.

2° Les espèces indigènes de la fermentation lactique : *Bacillus lacticus* de Pasteur, le *Streptococcus acidilactici*. Tous ces bouillons nous ont donnés par litre sur 18 analyses :

9 échantillons plus de 30 grammes d'acide lactique en 48 heures.

3	—	au-dessus de 25 gr.	—	—	—
1	—	—	20	—	—
3	—	—	15	—	—
2	—	néant	—	—	—

Sauf ceux accidentellement stériles, aucun ne nous a donné moins de 10 grammes. Leur conservation est longue, toujours supérieure à 4 mois, donnant en 48 heures de culture plus de 15 grammes d'acide lactique par litre. Les cultures liquides nous semblent donc les meilleurs modes d'administration médicale des ferments lactiques. Seuls les bouillons de ferments lactiques bien préparés, pourront être employés ; quand on ne craint pas de faire ingérer d'assez grandes quantités d'acide lactique que ces cultures contiennent toujours à l'état libre.

Les comprimés bien préparés ont par contre cet avantage d'être très peu acides au moment de l'ingestion, l'acidité n'étant créée que dans l'intestin.

Ces préparations sont très variables et ce n'est que par la surveillance des produits livrés qu'ils peuvent continuer à offrir de l'intérêt. Les bacilles qu'ils contiennent doivent demeurer vivants car comme le disait METCHNIKOFF (1) « dans la lutte contre les putréfactions intestinales, au lieu d'administrer l'acide en substance, il faut introduire dans l'organisme des cultures de microbes lactiques. Puisque ces bactéries s'acclimatent dans le tube digestif de l'homme, y trouvent des matières sucrées pour leur entretien, elles peuvent produire leurs subs-

(1) METCHNIKOFF. — Essais optimistes, 1907, page 223.

tances désinfectantes et servir pour le bien de l'organisme qui les entretient ».

D'après nos recherches et ceux de nos prédécesseurs, un grand nombre de préparations lactiques sont totalement dépourvues de pouvoir thérapeutiques.

Toutes ces préparations devront être soumise, au contrôle bactériologique et être l'objet d'une surveillance sévère et permanente, étant donné l'extension que la bactériothérapie ne peut manquer de prendre, tant par l'emploi des ferments lactiques, que par celui d'autres microbes.

D'après Albert BERTHELOT (1), ces cultures ne devraient être considérées, comme assez actives, que lorsqu'elles sont susceptibles de déterminer à la dose de $1/2 \text{ cm}^3$ la coagulation de 20 cm^3 de lait en 24 heures à 37° .

Pour nous il y a lieu d'exiger la production de 5 grammes d'acide lactique par litre de bouillonensemencé avec 5 grammes de comprimés en poudre et 10 grammes pour les cultures de préparations liquidesensemencées avec 1 cm^3 de liquide, après 48 heures de cultures à 37° .

Il serait donc indispensable d'exiger sur la boîte comme le font certains industriels, la date de fabrication. D'après nos recherches, après 4 à 5 mois les variations dans les chiffres d'acide lactique sont très peu considérables.

Le contrôle bactériologique s'impose. Pour les préparations destinées au traitement de l'appareil digestif, on est en droit d'exiger une grande richesse en ferments lactiques actifs, l'absence de bactéries pathogènes, mais on peut tolérer la présence de microorganismes saprophytes (comprimés, bouillons, etc.)

Pour celles destinées au traitement des rhinites, sinusites, métrites, le pansement des plaies, on devra être inflexible et n'admettre que des cultures bactériologique-

(1) A. BERTHELOT. — Nouvelles applications à la Bactériothérapie lactique. *Revue de Médecine*, août 1910.

ment pures, de ferments lactiques en pleine activité. Il n'y a donc pas lieu ici de s'occuper des laits caillés et des comprimés, leur nature même leur interdisant toute autre destination que le traitement des affections de l'intestin. Nous devons également signaler, l'action de la compression détruisant une partie des bacilles employés. Il faudra dans la fabrication des comprimés recourir à la pression la moins forte et la pression trop forte peut détruire une partie des bacilles employés et supprimer les broyages mécaniques trop violents.

Enfin attirons l'attention sur l'action de l'air sur les ferments, disparition de ces derniers à la surface dans les poudres. Intérêt qu'il y aurait à maintenir ces poudres à l'abri de l'air, et peut-être à pratiquer l'enrobage des comprimés.

Il reste encore de nombreuses expériences physiologiques à réaliser ; notamment en ce qui concerne l'action thérapeutique des bacilles non vivants, question déjà amorcée par BELONWSKI (1).

(1) BELONWSKI.— Influence du ferment lactique sur la flore intestinale de la souris (*Annales Institut Pasteur*, 1909, page 991).

Vu :

Le Doyen de la Faculté,
H. ROGER.

Vu bon à imprimer :

Le Président de Thèse,
Ch. ACHARD.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
APPELL.

CHAPITRE XII.

Bibliographie.

- BECQUET. — Contribution à l'étude de l'action du bacille bulgare sur la flore intestinale, Thèse, Ecole sup. Pharm., Paris, 1914.
- BERTRAND et WEISWEILER. — Action du ferment lactique sur le lait, *Annales Institut Pasteur*, p. 977, 1906.
- BERTRAND et DUCHACK. — Action du ferment bulgare sur le lait, *Annales Institut Pasteur*, p. 402, 1909.
- BELONWSKI. — Influence du ferment lactique sur la flore intestinale de la souris, *Annales Institut Pasteur*, p. 991, 1907.
- BERTHELOT (Albert) et BERTRAND (D. M.). — La nécessité d'un contrôle bactériologique des ferments lactiques pharmaceutiques, *Annales des Falsifications*, p. 165, 1912.
- BERTHELOT (A.). — Nouvelles applications à la bactériothérapie lactique, *Revue de Médecine*, août 1910.
- BEIJERINCK. — Sur les fermentations lactiques de l'industrie, *Arch. néerl. des Sciences nat.*, 1911.
- BOUVET (L.). — Sur un essai rapide des poudres de « ferments lactiques », *Bulletin des Sciences pharmacologiques*, p. 483, 1913.
- COHENDY. — Essai d'acclimatation microbienne persistante dans la cavité intestinale, *Soc. biol.*, p. 364, 1906.
- COHENDY. — Morphologie de la flore intestinale de l'homme, *Soc. biol.*, p. 415, 1906.

- COHENDY. — Ferments lactiques, *Soc. biol.*, p. 558, 1906.
- Description d'un ferment lactique puissant capable de s'acclimater dans l'intestin de l'homme, *Soc. biol.*, p. 558, 23 fév. 1906.
- COHENDY. — Essai de traitement de l'entérite muco-membraneuse aiguë par l'acclimation d'un ferment lactique dans le gros intestin, *Soc. biol.*, p. 872, 19 mai 1906.
- COHENDY. — De la désinfection intestinale obtenue sans régime spécial par l'acclimation d'un ferment lactique dans le gros intestin, *Soc. biol.*, p. 602, 1906.
- DENYS et MARTIN. — Sur les rapports du *Pneumobacille* de Friedlander, du ferment lactique et de quelques autres microorganismes avec le *Bacillus lactis ærogenus* et le *Bacillus typhosus*, *La Cellule*, IX, 1893.
- DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, T. IV.
- EFFRONT (J.). Les laits fermentés, à propos des ferments lactiques médicaux, *Moniteur Scientifique de Quesneville*, p. 489, août 1911.
- EFFRONT (J.). — *Soc. de Thérapeutique*, n° 22, p. 853-862, Nov. 1911.
- GRIMBERT. — *Société de Pharmacie de Paris*, 9 juin 1909.
- GRINGOROFF. — Etude sur le lait fermenté comestible, *Revue Médicale de la Suisse Romande*, XXV, p. 714, 1905.
- HARDEN et WALPOLE. — Proceedings of the Royal Society, T. LXXVII, p. 399, 1906.
- HENNEBERG. — Trochene oder flussige Yoghurtpreparate, *Tageszeitung fur Brauerei*, n° 297, p. 1751, déc. 1911.
- HERZOG. — Sur la fermentation lactique, *Bull. Institut Pasteur*, p. 381, 1903.
- KAYSER. — Etude sur la fermentation lactique. *Ann. Institut Pasteur*, p. 737, 1894.
- KAYSER. — Contribution à l'étude de la fermentation lactique, *Bull. Institut Pasteur*, p. 144, 1905.
- KUFFERATH. — Sur le mode d'ensemencement de ferments lactiques dans les milieux sucrés artificiels employés dans l'industrie, *Bull. Soc. biol.*, n° 17, p. 199, 21 fév. 1920.
- LEHMANN et NEUMANN (Philibert). — *Manuel de Bactériologie*, 1913 ; Palier, *Société de Thérapeutique*, 1908.

- LISTER. — On the lactic fermentation and its bearing on pathology *Transact of the pathol. Society*, XXIX, 1878.
- LUERSSEN (A.) et KUHN. — *Centralblatt für Bacteriologie Parasiten und Infektionskrankheiten*, XX, p. 234, 1908.
- MACÉ. — *Traité de Bactériologie*, T. II, p. 452-519.
- MAZÉ. — Les microbes de l'industrie fromagère, *Ann. Institut Pasteur*, XIV, p. 397.
- METCHNIKOFF. — Médicaments microbiens, bactériothérapie. — Vaccination et sérothérapie.
- METCHNIKOFF. — Essais optimistes, Paris, 1907.
- Microbes et longévité, *La Revue*, p. 145, 15 janv. 1911.
- METCHNIKOFF. — Quelques remarques sur le lait aigri. Desgranges, éditeur, Paris, 1906.
- Etude sur la flore intestinale, *Ann. Institut Pasteur*, p. 952, 1908 ; p. 755, 1910.
- OEHLEK (L.). — Ueber Yoghurtkontrolle, *Centralblatt, f. Bakter.* T. XXX, 30 mai 1811.
- PASTEUR. — Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Ann. de Chimie et de Pharmacie*, 3^e série, T. II, p. 404, 1862.
- PERÉ. — Sur la formation des acides lactiques isomériques par l'activité des microbes sur les substances hydrocarbonées, *Ann. Institut Pasteur*, VII, p. 737, 1893.
- POITTEVIN. — Contribution à l'étude de la fermentation lactique, *Bull. Instit. Pasteur*, p. 49, 1898.
- RICHE. — Adaptation des microbes (ferment lactique) au milieu, *Ann. Instit. Pasteur*, p. 22, 1915.
- RIST et KHOURY. — Etude sur un lait fermenté comestible : le leben d'Égypte, *Ann. Instit. Pasteur*, XVI, p. 65, 1902.
- ROSENTHAL et CHARAZAIN-WETZEL. — Les bases scientifiques de la bactériothérapie par les ferments lactiques : Bacille bulgare contre Bacille pyocyanique, *Soc. biol.*, 15 janv. 1910.
- TISSIER. — Traitement des infections intestinales par la méthode des transformations de la flore de l'intestin, *S. B.*, 23 fév. 1906.

TISSIER. — Flore intestinale des enfants, *Ann. de l'Institut Pasteur*, p. 189, 1908.

TISSIER. — Microbes de l'intestin des nourrissons, *Ann. Instit. Pasteur*, p. 109.

VAN STEENBERGE. — L'autolyse de la levure et de l'influence de ses produits de protéolyse sur le développement de la levure et des microbes lactiques, *Ann. Instit. Pasteur*, p. 601, 1917.

VAN STEENBERGE. — Les propriétés des microbes lactiques, leur classification, *Ann. Instit. Pasteur*, p. 802, 1921.

WURTZ et LINDET. — Recherches sur l'activité pathogène du *Bacillus lacticus*, *Arch. Méd. expériment.*, III, p. 485.

WURTZ et LINDET. — Identité du *Bacillus lactique* et du *Bacillus lactis ærogenus*, *Soc. biol.*, p. 531, 1893.

YORTMANN. — Analyse des substances organiques, 1891.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages.
INTRODUCTION. — Considérations générales sur la Bacté- riothérapie lactique	1
CHAPITRE PREMIER. — Historique : Nécessité du contrôle bactériologique et chimique des « ferments lac- tiques »	7
CHAPITRE II. — Des préparations lactiques, leurs exa- mens de laboratoire	10
CHAPITRE III. — Examens bactériologiques des prépa- rations lactiques	13
a) Technique.	14
b) Revivifications des espèces	14
c) Milieux de cultures	15
d) Ensemencements	15
e) Séparations des espèces	15
f) Résultats : Comprimés. Bouillons	17-18
CHAPITRE IV. — Caractères microscopiques des espèces isolées	19
1° Méthode de coloration	19
2° Caractères des bactéries	20
CHAPITRE V. — Bactéries de la fermentation lactique	21
CHAPITRE VI. — Description des espèces isolées des prépa- rations	24
<i>Bacillus lacticus</i>	24
— <i>bulgaricus</i>	25
— <i>mesentericus vulgatus</i>	26
— — <i>ruber</i>	27

<i>Bacillus subtilis</i>	28
— <i>caucasicus</i>	29
— <i>bifidus</i>	30
<i>Streptococcus acidilactici</i>	31
Levures.....	33
CHAPITRE VII. — Etudes chimiques des préparations	
lactiques.....	34
Recherche et dosage de l'acide lactique	35
1° Procédé par extraction à l'éther.....	35
2° Méthode Bertrand et Weisweiller	35
3° — Bouvet	37
4° — de Bellet.....	37
5° — de dosage par pesée de la chaux dissoute.....	38
6° — personnelle.....	40
a) Milieu de culture	40
b) Ensemencement.....	40
c) Recherche qualitative de l'acide lactique..	41
d) Dosage	42
e) Recherche de l'acide lactique préexistant dans les préparations lactiques	44
Calculs.....	43
CHAPITRE VIII. — Résultats obtenus.....	
Préparations sèches: 1° Comprimés; 2° Poudres.	45-47
Préparations liquides: Bouillons.....	48
CHAPITRE IX. — Quantité d'acide lactique exigé d'un produit considéré normal.....	
	51
CHAPITRE X. — Protocole d'expérience pour l'analyse d'une préparation médicamenteuse à ferments lacti- ques.....	
	54
CHAPITRE XI. — Conclusions.....	
	55
CHAPITRE XII. — Bibliographie.....	
	61

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.
